

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/78, 16/18, A61K 38/39, 39/395, G01N 33/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40073
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Oktober 1997 (30.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02012		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KG, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. April 1997 (22.04.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 15 710.2 22. April 1996 (22.04.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HAEMOPEP PHARMA GMBH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 5, D-30625 Hannover (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 24. Dezember 1997 (24.12.97)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHRADER, Michael [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). RAIDA, Manfred [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			
(54) Title: BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN (COLLAGEN FRAGMENT HF-COLL-18/514cf) FOR INHIBITING THE GROWTH OF TUMOURS AND CAPILLARY PROFILERATIONS			
(54) Bezeichnung: BIOLOGISCH AKTIVER EIWEISSSTOFF - KOLLAGENFRAGMENT HF-COLL-18/514cf - ZUR HEMMUNG DES WACHSTUMS VON TUMOREN UND VON GEFÄSSWUCHERUNGEN			
(57) Abstract <p>The invention relates to a peptide from human blood, HF-COLL-18/514cf. For the purpose of diagnostic, medical and commercial use as a drug, the structure of said peptide has been identified. Isolation of said novel peptide, HF-COLL-18/514cf, proves the existence of HF-COLL-18/514cf. The molecular form of HF-COLL-18/514cf has been revealed by mass spectrometry and amino-terminal sequencing, and the fact that HF-COLL-18/514cf is a natural peptide which should be used to treat numerous diseases related to cell growth disorders, in particular of endothelial cells and vessels, and for example in cancer. HF-COLL-18/514cf can also be used commercially in a pure form or as a natural raw extract when researching new cell functions.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Peptid aus menschlichem Blut, das HF-COLL-18/514cf, das zum Zwecke der diagnostischen, medizinischen und gewerblichen Verwendung als Arzneimittel in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Die Isolierung dieses neuartigen Peptides HF-COLL-18/514cf beweist die Existenz des HF-COLL-18/514cf. Die Molekülform des HF-COLL-18/514cf wurde durch Massenspektrometrie und aminoterminal Sequenzierung bewiesen, und daß HF-COLL-18/514cf ein natürliches Peptid darstellt, welches zur Behandlung von zahlreichen Erkrankungen, die mit Störungen des Wachstums von Zellen, insbesondere von Endothelzellen und Gefäßen einhergehen und z.B. bei Krebs benutzt werden sollte. Weiter kann das HF-COLL-18/514cf in reiner Form oder als natürliches Rohextrakt für gewerbliche Zwecke in der Erforschung neuer Zellfunktionen benutzt werden.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Biologisch aktiver Eiweißstoff - Kollagenfragment HF-COLL-18/514cf - zur Hemmung des Wachstums von Tumoren und von Gefäßwucherungen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Peptid (Eiweißstoff) mit der Fähigkeit, das Wachstum von Zellen zu beeinflussen. Das Kollagenfragment HF-COLL-18/514cf, sowie von ihm abgeleitete Fragmente und/oder Derivate sowie ein Arzneimittel das die natürlichen und synthetischen Peptide enthält kann zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Eiweißstoffes in reiner oder partiell aufgereinigter Form aus menschlichen Körperflüssigkeiten, der die Fähigkeit besitzt, das Wachstum von Zellen erstaunlich zu beeinflussen und damit Gefäß- und Tumorwachstum zu hemmen. Ein ähnlicher Stoff konnte vor kurzem in der Maus nachgewiesen werden (O'Reilly et al., 1997, Cell Vol.88, Seite 277). Dieser Stoff ist dagegen dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere aus Hämofiltrat oder Hämodialysat, das aus menschlichem Blut abfiltriert wird, gewonnen werden kann. Der Stoff ist als HF-COLL-18/514cf bezeichnet und kann zum Zwecke (1) der Analyse von Erkrankungen, (2) zur medizinischen und gewerblichen Verwendung als Medikament benutzt werden.

Der Stoff HF-COLL-18/514cf wurde erstmals aus dem Hämofiltrat Nierenkranker nach Ultrafiltration am Hämodialyseapparat gewonnen und wurde nach seiner molekularen Masse und den 60 Aminosäu-

ren des N-Terminus charakterisiert. Zur Darstellung des HF-COLL-18/514cf wurde ein patentiertes Verfahren (Forssmann, 1988; Offenlegungsschrift DE 36 33 707 A1) verfeinert, welches zuvor für Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hemofiltrat erfunden wurde. Aus den mit diesem Verfahren gewonnenen Molekülen von einem Molikulargewicht unter 20 Kilodalton, die bei veno-venöser oder arterio-venöser Shuntverbindung abfiltriert werden, können die das HF-COLL-18/514cf enthaltende Fraktionen überraschenderweise durch Massenspektrometrie erkannt werden. Es wurde weiter festgestellt, daß bei speziellen weiteren Verfahren diese Substanz erstaunlicherweise derart aufgereinigt werden konnte, bis schließlich ein einheitlicher Eiweißstoff identifiziert und in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Der Stoff ist überraschenderweise ein Fragment von einem Protein, wobei das Protein bisher lediglich auf cDNA-Ebene bekannt ist (Oh et al., 1994, Genomics Vol. 19, Seite 494). Der Wert dieser Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß dieser Stoff aus dem bisher als wertlos betrachteten Hemofiltrat aufgereinigt werden kann, um als wirtschaftlich verwertbare Substanz benutzt zu werden.

Damit wurde eine Verbindung isoliert, deren Struktur bisher unbekannt war und deren Bildungsstätte im Körper noch ungeklärt ist. Die therapeutische und wirtschaftliche Verwendung wurde geprüft und das HF-COLL-18/514cf wurde überraschenderweise als wichtiges zirkulierendes Peptid des menschlichen Blutes erkannt.

Der genannte Stoff HF-COLL-18/514cf kann durch chemische Synthese und durch gentechnologische Produktion gewonnen werden und ist für zahlreiche weitere Belange nutzbar, unter anderem für die Analyse im menschlichen Blut als pathognomonisches Diagnosemerkmal von Erkrankungen des Gefäßwachstums, des Wachstums von Tumoren und von Metastasen.

Die vorliegende Erfindung betrifft also ein neues Peptid, das HF-COLL-18/514cf, seine Herstellung, dieses enthaltende Arzneimittel sowie dieses enthaltende Aufbereitungen und seine Verwendung dafür, sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträg-

lichen Derivate, insbesondere amidierete, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte HF-COLL-18/514cf-Derivate und Fragmente des Peptides. Durch Massenspektrometrie konnte ein mittleres Molekulargewicht von 18494 u Dalton festgestellt werden.

Das Blutpeptid HF-COLL-18/514cf hat die Aminosäuresequenz:

Val-Ala-Leu-Asn-Ser-Pro-Leu-Ser-Gly-Gly-Met-Arg-Gly-Ile-Arg-Gly-Ala-Asp-Phe-Gln-Cys-Phe-Gln-Gln-Ala-Arg-Ala-Val-Gly-Leu-Ala-Gly-Thr-Phe-Arg-Ala-Phe-Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Gln-Asp-Leu-Tyr-Ser-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Ile-Val-Asn-Leu-Lys-Asp-Glu-Leu-Leu-Phe-Pro-Ser-Trp-Glu-Ala-Leu-Phe-Ser-Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Lys-Pro-Gly-Ala-Arg-Ile-Phe-Ser-Phe-Asp-Gly-Lys-Asp-Val-Leu-Arg-His-Pro-Thr-Trp-Pro-Gln-Lys-Ser-Val-Trp-His-Gly-Ser-Asp-Pro-Asn-Gly-Arg-Arg-Leu-Thr-Glu-Ser-Tyr-Cys-Glu-Thr-Trp-Arg-Thr-Glu-Ala-Pro-Ser-Ala-Thr-Gly-Gln-Ala-Ser-Ser-Leu-Leu-Gly-Gly-Arg-Leu-Leu-Gly-Gln-Ser-Ala-Ala-Ser-Cys-His-His-Ala-Tyr-Ile-Val-Leu-Cys-Ile-Glu-Asn-Ser-Phe-Met-Thr-Ala-Ser

Das durch die vorliegende Erfindung bereitgestellte Peptid, das HF-COLL-18/514cf, ist nunmehr ein gut zugängliches Arzneimittel mit biologischer und therapeutischer Aktivität eines natürlichen Analogons des im Blut vorkommenden Stoffes.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Herstellungsverfahren für dieses HF-COLL-18/514cf sowie die Anwendung des HF-COLL-18/514cf als Arzneimittel für verschiedene therapeutische und diagnostische Indikationen zur Verfügung. Dazu kann das HF-COLL-18/514cf als hochreiner Stoff oder - wenn für die bestimmte Verwendung ausreichend - innerhalb eines teilweise aufgereinigten Peptidgemisches verwandt werden.

Das erfindungsgemäße Peptid, seine Derivate und Fragmente können durch verschiedene Verfahren hergestellt werden, z.B. über eine prokaryontische oder eine eukaryontische Expression und gegebenenfalls chromatographische Reinigung. Des weiteren läßt es sich aus menschlichem Blut z.B. über an sich bekannte Chromatographie-Verfahren isolieren. Schließlich sind HF-COLL-18/514cf oder

seine Derivate oder Fragmente durch übliche Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der angegebenen Sequenz enthalten sind, herstellbar. Nach Entfernung der Schutzgruppen kann es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren gereinigt werden.

Die erfindungsgemäße Arzneimittelzubereitung enthält HF-COLL-18/514cf oder ein physiologisch verträgliches Salz des HF-COLL-18/514cf. Die Form und Zusammensetzung des Arzneimittels, welches das HF-COLL-18/514cf enthält, richtet sich nach der Art der Verabreichung. Das humane HF-COLL-18/514cf kann parenteral, intranasal, oral, intravenös, intramuskulär, intracutan, intrathekal, lokal-topisch sowie transpulmonal verabreicht werden. Vorzugsweise wird HF-COLL-18/514cf zu einem Injektionspräparat, entweder als Lösung oder als Lyophilisat zur Auflösung unmittelbar vor Gebrauch, konfektioniert. Die Arzneimittelzubereitung kann außerdem Hilfsstoffe enthalten, die abfülltechnisch bedingt sind, einen Beitrag zur Löslichkeit, Stabilität oder Sterilität des Arzneimittels leisten oder den Wirkungsgrad der Aufnahme in den Körper erhöhen. Insbesondere die Verwendung der lyophilisierten, mit Mannit aufgenommenen Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 30 Mikrogramm bis 30 Milligramm reines HF-COLL-18/514cf pro Therapie-Einheit, ist vorteilhaft.

Die zu verabreichende Tagesdosis für HF-COLL-18/514cf hängt von der Indikation und der Anwendung bestimmter Derivate ab. Bei i.v./i.m. Injektion liegt sie im Bereich von 100 bis 1200 Einheiten (μg)/Tag, bei täglicher subcutaner Injektion vorzugsweise bei 300 bis 2400 Einheiten (μg)/Tag.

Das erfindungsgemäße Peptid HF-COLL-18/514cf ist dadurch gekennzeichnet, daß es sich besonders auch für die Langzeit-Therapie bei Tumorerkrankungen oder anderen Erkrankungen die durch ein unkontrolliertes Gefäßwachstum gekennzeichnet sind, eignet und bei Dauerbehandlung keine Immunreaktion auslöst. Das erfin-

dungsgemäße Präparat ist insbesondere für die Kombinationstherapie mit Chemo- oder Strahlentherapie oder in Anschluß an Chemo- oder Strahlentherapie bei Krebs geeignet.

Das erfindungsgemäße Präparat ist weiter als Mittel zur Therapie und Diagnose bei Gefäßerkrankungen des Stütz- und Bindegewebes, der Atemwege, des Herz-Kreislaufsystems und Urogenitalapparates, des Nervensystems und des Auges einzusetzen, da es zur Herstellung von human verträglichen Antikörpern verwandt werden kann die geeignet sind, Änderungen des Gefäßwachstums in diesen Organen festzustellen oder zu beeinflussen.

Solche Antikörper sind grundsätzlich erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit dem erfindungsgemäßen Peptid und/oder seinen Fragmenten oder durch Anwendung der Hybridoma-Technologie.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Behandlung von Patienten, die HF-COLL-18/514cf oder seine Derivate oder Fragmente benötigen, durch Gabe therapeutischer Mengen von HF-COLL-18/514cf. Patienten, die unter einer überhöhten Produktion von HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate oder Fragmente leiden, benötigen die Gabe therapeutischer Mengen eines Antagonisten/Inhibitors des HF-COLL-18/514cf.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel ist zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere in Verbindung mit Gefäßwucherungen, Krebserkrankungen, Erkrankungen mit Beteiligung des Herzkreislauf- und Nervensystems, Erkrankungen mit Beteiligung des Integumentes und der Sinnesorgane, insbesondere des Auges, geeignet.

Erfindungsgemäß wird die Verwendung des Peptids oder seiner Derivate, der Fragmente oder des erfindungsgemäßen Antikörpers zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Störungen bei entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Proliferations- und Reifungsstörungen des blutbildenden Systems, von Systemerkrankungen bei Überproduktion oder Mangel von HF-

COLL-18/514cf, insbesondere bei z.B. durch Anwendung gegen dieses gebildete Antikörper oder zur Verwendung von HF-COLL-18/514cf zur Substitutionstherapie, chronischen Erkrankungen, teils vergesellschaftet mit den genannten Erkrankungen, indem es in geeigneter Form für die Behandlung für die Elektrolytwirkung bei Tumor- und Gefäßerkrankungen benutzt wird, beansprucht.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel ist zur Behandlung von akuten Erkrankungen oben genannter Art geeignet, indem es in entsprechender Form für die Behandlung in der Intensivpflege dieser Erkrankungen benutzt wird.

Eine weitere Verwendung des erfindungsgemäßen Peptids, seiner Fragmente oder des erfindungsgemäßen Antikörpers erfolgt zur Diagnose von Erkrankungen, indem spezifische Antikörper gegen synthetische Teilstücke oder das gesamte Peptid oder seiner Derivate und seiner Fragmente hergestellt werden und z.B. die Blutkonzentration des HF-COLL-18/514cf über Immuntests gemessen wird.

Ein Diagnostikumittel enthaltend das erfindungsgemäße Peptid, seine Fragmente oder erfindungsgemäße Antikörper für Testsysteme zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Substanz sind somit auch Gegenstand der Erfindung. Das erfindungsgemäße Diagnostikumittel ist insbesondere als Marker für bestimmte Krebserkrankungen sowie für Funktionsstörungen von Blutgefäßen, Knochenmark, Lymphorganen, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von inflammatorischen sowie neoplastischen Prozessen, geeignet.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Isolierung und Charakterisierung von zirkulierendem
HF-COLL-18/514cf aus humanem Hämofiltrat

Als Ausgangsmaterial wurde Hemofiltrat verwendet, das in großen Mengen bei der Behandlung niereninsuffizienter Patienten anfällt und alle Plasmabestandteile bis zu einer Molekülgröße von etwa 20.000 Dalton enthält.

I. Gewinnung des Rohpeptidmaterials

Das Hemofiltrat wurde mittels einer Hemofiltrationsanlage der Firma Sartorius unter Verwendung von Celluloseetriacetat-Filtern mit einer Ausschlußgröße von 20.000 Dalton (Typ SM 40042, Sartorius, Göttingen, BRD) gewonnen. Das Filtrat stammte von niereninsuffizienten Patienten, die sich durch Langzeit-Hemofiltration in einer stabilen Stoffwechsellage befanden, und wurde unmittelbar nach der Gewinnung mittels Ansäuern und Abkühlung auf 4°C gegen proteolytischen Abbau geschützt. In vier Extraktionen mit einer Kationenaustauschersäule (TSK SP 650(M), Merck, Darmstadt, DE) wurden 2860 l Hämofiltrat verarbeitet. 93% der gepoolten Extrakte wurden auf dem obengenannten Säulenmaterial nacheinander durch verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten eluiert. Die Rohfraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet.

II. Präparative RP-Chromatographie

500 mg von 2200 mg der letzten Rohfraktion wurden mittels präparativer RP-Chromatographie grob nach Hydrophobizität getrennt. Von einer PrepPak Cartridge mit den Dimensionen 47 x 300 mm der Firma Waters wurden Fraktionen abgesammelt. Die Fraktion 31, wurde für die weitere Aufreinigung benutzt.

Gerät: BioCad HPLC (Perseptive Biosystems, Freiburg, DE)
Säule: Waters PrepPak Cartridge 47 x 300 mm
Material: Vydac, 300 Å, 15 - 20 µm
Eluent A: Wasser mit 10mM HCl

- 8 -

Eluent B: Methanol mit 10mM HCl
Gradient: 0 - 50 % Eluent B 28,57 min
 50 - 95 % Eluent B 61,43 min
 95 % Eluent B 5,71 min
Flußrate: 35 ml / min
Fraktionen: 50 ml bzw. 1,43 min
Detektion: 230 nm und 280 nm

III. Erste analytische RP-HPLC

UV-Absorption während der analytischen RP-Chromatographie der Fraktion 31, die aus der Auftrennung in Abbildung 1 gewonnen wurde. In einem Gradienten auf einer Vydac-Säule (10 x 250 mm Stahlmantel, Material: RP C18, 300 Å, 5 µm) konnte eine weitere Auftrennung erzielt werden. Die Eluenten waren Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure und Acetonitril mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure.

Gerät: Kontron HPLC-Anlage
Säule: Vydac, Stahlmantel 10 x 250 mm
Material: Vydac RP-C18, 300 Å, 5 µm
Eluent A: Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Eluent B: Acetonitril mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Gradient: 0 - 60 % Eluent B 50 min
 60 - 80 % Eluent B 5 min
 80 - 0 % Eluent B 5 min
Flußrate: 2 ml / min
Fraktionen: 2 ml bzw. 1 min
Detektion: 230 nm

IV. Entdeckung der molekularen Masse des HF-COLL-18/514cf mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Mit einem MALDI-Masenspekrometer RBT II (Vestec/PerSeptive, Houston, Texas, USA) wurden Massenspektren von dem nativen, gereinigten HF-COLL-18/514cf aus der Präparation im Schritt III mit alpha-Cyano-4-hydroxyzimtsäure als Matrix gemessen. In den

Fraktionen 45 und 46 zeigten sich Peaks von dem einfach, zweifach und dreifach protoniertem Molekül, mit einer molekularen Masse von etwa 18500 u. Verschiedene Nebenbestandteile waren außerdem sichtbar.

V. Zweite analytische RP-HPLC

In einer abschließenden analytischen RP-Chromatographie von den gepoolten Fraktionen 45 und 46, die aus der Auftrennung in Schritt III gewonnen wurden, konnte in der Fraktion 25 hochaufgereinigtes HF-COLL-18/514cf isoliert werden.

Gerät: Kontron HPLC (Kontron, München, DE)
Säule: YMC, Stahlmantel 4,6 x 250 mm
Material: YMC RP-C18, 300 Å, 5 µm
Eluent A: Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Eluent B: 80 % Acetonitril, 20 % Wasser
(V : V) mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Gradient: 0 - 30 % Eluent B 5 min
30 - 80 % Eluent B 150 min
80 - 100 % Eluent B 5 min
100 % Eluent B 5 min
Flußrate: 0,6 ml / min
Fraktionen: manuell abgesammelt
Detektion: 230 nm und 280 nm

VI. Reinheitsbestimmung mittels Kapillar-Zonen-Elektrophorese

5 µl der Fraktion 25 wurden direkt zur Messung in der Kapillar-Zonen-Elektrophorese verwendet. Das Elektropherogramm zeigt lediglich einen Peak und keine weiteren Peaks von Nebenbestandteilen. Dieses Ergebnis zeigt, daß in der Endreinigungsstufe ein hochreines HF-COLL-18/514cf vorlag.

Gerät: P/ACE System 2000, Beckman Instruments GmbH,
München, DE
Kapillare: Uncoated Fused Silica, 500 mm x 75 µm ID

- 10 -

Puffer: 100 mM Natriumphosphat pH 2,5
0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose
Temperatur: 25°C
Injektion: 20 sec entspricht 120 nl
Laufzeit: 25 Minuten
Strom: 80 μ A, konstant
Detektion: 200 nm

VII. Bestimmung der molekularen Masse von HF-COLL-18/514cf

Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf einem Vestec BT II des nativen, gereinigten HF-COLL-18/514cf aus Fraktion 25 im Schritt V konnten auf zwei Matrices (α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure) Spektren erhalten werden. Es zeigen sich Peaks von dem einfach, zweifach und dreifach protoniertem Molekül. Die molekulare Masse wird mit $18507 \text{ u} \pm 20 \text{ u}$ bestimmt. Nebenbestandteile sind nicht sichtbar.

Für eine genauere Bestimmung der molekularen Masse des nativen, gereinigten HF-COLL-18/514cf wurde aus Fraktion 25 des Schrittes V zusätzlich ein Massenspektrum mit einem Elektrospray-Massenspektrometer (Sciex API III, Perkin-Elmer, Langen, DE) gemessen. Es zeigen sich Peaks von dem acht- bis elffach protoniertem Molekül. Die mittlere molekulare Masse von HF-COLL-18/514cf wird hier mit $18494 \text{ u} \pm 3 \text{ u}$ bestimmt, der theoretische Wert beträgt 18496 u (siehe VIII).

VIII. Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz

Mittels automatisierter Edman-Sequenzierung mit einem Gasphasen-Aminosäure-Sequenator ABI 494 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Weiterstadt, DE) wurden die ersten 60 Aminosäuren bestimmt. An 21. Stelle (Xxx) wurde keine Aminosäure detektiert, wie es für Cystein üblich ist.

Val-Ala-Leu-Asn-Ser-Pro-Leu-Ser-Gly-Gly-Met-Arg-Gly-Ile-Arg-Gly-Ala-Asp-Phe-Gln-Xxx-Phe-Gln-Gln-Ala-Arg-Ala-Val-Gly-Leu-Ala-Gly-

Thr-Phe-Arg-Ala-Phe-Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Gln-Asp-Leu-Tyr-Ser-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Ile-Val

Damit wurde festgestellt, daß es sich um ein Fragment von Kollagen alpha 1 (XVIII) handelt, wobei dieses Protein bisher lediglich auf cDNA-Ebene bekannt ist (Oh et al., 1994, Genomics Vol. 19, Seite 494). Das Fragment beginnt an der Position 514 des Protein-Precursors und die molekulare Masse zeigt, daß es an vorletzter Stelle des Precursors mit der Aminosäure Serin endet, also C-terminal um ein Lysin verkürzt ist.

Beispiel 2: Untersuchung der biologischen Wirksamkeit von HF-COLL-18/514cf

Anhand des in Beispiel 1 dargestellten Verfahrens wurde eine größere Materialmenge von mehr als 0,1 mg HF-COLL-18/514cf aus humanem Hämofiltrat isoliert. Das hochreine HF-COLL-18/514cf wurde zur Bestimmung der biologischen Funktion in Endothelzell-Proliferationsassays eingesetzt. Für diesen Assay wurden bovine Kapillarendothelzellen aus der Nebennierenrinde von frisch geschlachteten Kälbern, wie in der Literatur beschrieben (Folkman et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 76, Seite 5217), in Kultur genommen.

Die Ausführung des Proliferationsassays wurde, wie in der Literatur beschrieben (O'Reilly et al., 1997, Cell Vol.88, Seite 277), durchgeführt. Die bovinen Kapillarendothelzellen wurden dazu mit PBS (Phosphatpuffer mit Kochsalz, pH 7.4) gewaschen und in einer 0,05 %igen Trypsinlösung suspendiert. Eine Zellsuspension mit 25000 Zellen pro ml in DMEM-Medium, enthaltend 10 % FKS (Fötales Kälberserum) und 1 % GPS (Glutamin-Penicillin-Streptomycin), wurde in gelatine-beschichteten 24-Loch-Platten (0,5 ml pro Loch) bei 37°C und 10 % CO₂ inkubiert.

Nach 24 h wurde das Medium ersetzt durch 0.5 ml DMEM-Medium, enthaltend 5% FKS und 1% GPS sowie unterschiedlichen Konzentrationen (von 0 bis 1000 ng/ml Endkonzentration) des isolierten, hochreinen HF-COLL-18/514cf, ersetzt. Nach weiteren 30

- 12 -

Minuten Inkubation wurde den Ansätzen bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) in einer Endkonzentration von 1 ng/ml zugegeben. Nach 72 h wurde die Zellzahl in den Ansätzen durch eine Kristallviolettffärbung der Zellen und Messung der Absorption bei 600 nm bestimmt. Das den bovinen Kapillarendothelzellen zugegebene HF-COLL-18/514cf hemmte in konzentrationsabhängigerweise die mit bFGF stimulierte Proliferation dieser Zellen. Eine halbmaximale Hemmung der Proliferation in diesem Assay wurde bei einer Konzentration von 200 ng/ml HF-COLL-18/514cf erreicht.

Um die Spezifität des Wirkungsspektrums von HF-COLL-18/514cf und damit mögliche andere biologische Funktionen zu untersuchen, wurden Proliferationsassays mit nicht-endothelialen Zellen durchgeführt. In Tests mit Fibroblasten-Zelllinien, nämlich NIH 3T3-Zellen und LMTK-Zellen, zeigte HF-COLL-18/514cf keine signifikante Wirkung und damit auch keine antiproliferative Wirkung.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Str. 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Biologisch aktiver Eiweissstoff -
Kollagenfragment HF-COLL-18/514cf - zur Hemmung des
Wachstums von Tumoren und von Gefaesswucherungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 170 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Val	Ala	Leu	Asn	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Gly	Met	Arg	Gly	Ile	Arg	Gly	1	5	10	15
Ala	Asp	Phe	Gln	Cys	Phe	Gln	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gly	Leu	Ala	Gly	20	25	30	
Thr	Phe	Arg	Ala	Phe	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Gln	Asp	Leu	Tyr	Ser	Ile	35	40	45	
Val	Arg	Arg	Ala	Asp	Arg	Ala	Ala	Val	Pro	Ile	Val	Asn	Leu	Lys	Asp	50	55	60	
Glu	Leu	Leu	Phe	Pro	Ser	Trp	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	65	70	75	80
Pro	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Arg	Ile	Phe	Ser	Phe	Asp	Gly	Lys	Asp	Val	85	90	95	
Leu	Arg	His	Pro	Thr	Trp	Pro	Gln	Lys	Ser	Val	Trp	His	Gly	Ser	Asp	100	105	110	

- 14 -

Pro	Asn	Gly	Arg	Arg	Leu	Thr	Glu	Ser	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Arg	Thr
		115					120					125			
Glu	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Gly	Gln	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg
	130					135					140				
Leu	Leu	Gly	Gln	Ser	Ala	Ala	Ser	Cys	His	His	Ala	Tyr	Ile	Val	Leu
145					150					155					160
Cys	Ile	Glu	Asn	Ser	Phe	Met	Thr	Ala	Ser						
				165					170						

Ansprüche

1. Peptid mit der Aminosäuresequenz

Val-Ala-Leu-Asn-Ser-Pro-Leu-Ser-Gly-Gly-Met-Arg-Gly-Ile-Arg-Gly-Ala-Asp-Phe-Gln-Cys-Phe-Gln-Gln-Ala-Arg-Ala-Val-Gly-Leu-Ala-Gly-Thr-Phe-Arg-Ala-Phe-Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Gln-Asp-Leu-Tyr-Ser-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Ile-Val-Asn-Leu-Lys-Asp-Glu-Leu-Leu-Phe-Pro-Ser-Trp-Glu-Ala-Leu-Phe-Ser-Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Lys-Pro-Gly-Ala-Arg-Ile-Phe-Ser-Phe-Asp-Gly-Lys-Asp-Val-Leu-Arg-His-Pro-Thr-Trp-Pro-Gln-Lys-Ser-Val-Trp-His-Gly-Ser-Asp-Pro-Asn-Gly-Arg-Arg-Leu-Thr-Glu-Ser-Tyr-Cys-Glu-Thr-Trp-Arg-Thr-Glu-Ala-Pro-Ser-Ala-Thr-Gly-Gln-Ala-Ser-Ser-Leu-Leu-Gly-Gly-Arg-Leu-Leu-Gly-Gln-Ser-Ala-Ala-Ser-Cys-His-His-Ala-Tyr-Ile-Val-Leu-Cys-Ile-Glu-Asn-Ser-Phe-Met-Thr-Ala-Ser (HF-COLL-18/514cf)

sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte Derivate.

2. Fragmente des Peptids nach Anspruch 1, die pharmakologisch aktiv sind.
3. Verfahren zur Herstellung des Peptids nach Anspruch 1 und/oder seiner Fragmente nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieses über eine prokaryontische oder eine eukaryontische Expression hergestellt wird.
4. Verfahren zur Herstellung des Peptids nach Anspruch 1 und/oder seiner Fragmente nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man es aus menschlichem Blut über Chromatographie-Verfahren isoliert.

5. Verfahren zur Herstellung des Peptids oder seiner Derivate nach Anspruch 2 und seiner Fragmente nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Peptid oder seine Derivate oder Fragmente durch übliche Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der ausgegebenen Sequenz enthalten sind, herstellt, deblockiert und es mit an sich bekannten Chromatographie-Verfahren reinigt.
6. Arzneimittel, die das Peptid nach Anspruch 1 oder seine Fragmente nach Ansprüchen 2 als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen enthalten.
7. Arzneimittel nach Anspruch 6 zur oralen, parenteralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen, intranasalen und lokal-topischen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
8. Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit einem Peptid nach Anspruch 1 und/oder Fragmenten nach Anspruch 2 und/oder durch Anwendung der Hybridoma-Technologie.
9. Verfahren zur Behandlung von Patienten, die HF-COLL-18/514cf oder seine Derivate oder Fragmente nach Anspruch 1 benötigen, durch Gabe therapeutischer Mengen von HF-COLL-18/514cf.
10. Verfahren zur Behandlung von Patienten, die eine Inhibition von HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate oder Fragmente nach Anspruch 1 oder 2 benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen eines Antagonisten/Inhibitors des HF-COLL-18/514cf.
11. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere in Verbindung mit Gefäßwucherungen.

12. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere bei Krebserkrankungen.
13. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung des Herzkreislauf- und Nervensystems.
14. Verwendung der Arzneimittel nach Ansprüchen 6 oder 7 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung des Intugementes und der Sinnesorgane, insbesondere des Auges.
15. Verwendung des Peptids oder seiner Derivate nach Anspruch 1, der Fragmente nach Anspruch 2 oder des Antikörpers nach Anspruch 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Störungen bei entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Proliferations- und Reifungsstörungen des blutbildenden Systems.
16. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 oder des Antikörpers nach Anspruch 8 zur Behandlung von Systemerkrankungen bei Überproduktion oder Mangel von HF-COLL-18/514cf, insbesondere bei z.B. durch Anwendung gegen dieses gebildete Antikörper oder zur Verwendung von HF-COLL-18/514cf zur Substitutionstherapie.
17. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 zur Behandlung von chronischen Erkrankungen, teils vergesellschaftet mit den in den Ansprüchen 11 bis 16 genannten Erkrankungen, indem es in geeigneter Form für die Behandlung für die Elektrolytwirkung bei Tumor- und Gefäßerkrankungen benutzt wird.
18. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 oder des Antikörpers nach Anspruch 8 zur Behandlung von akuten

Erkrankungen, gemäß Ansprüchen 11 bis 16, indem es in geeigneter Form für die Behandlung in der Intensivpflege dieser Erkrankungen benutzt wird.

19. Verwendung des Arzneimittels nach Ansprüchen 6 oder 7 oder des Antikörpers nach Anspruch 8 zur Diagnose von Erkrankungen, insbesondere nach irgendeinem der Ansprüche 11 bis 16, indem spezifische Antikörper gegen synthetische Teilstücke oder das gesamte Peptid oder seiner Derivate und seiner Fragmente hergestellt werden und die Blutkonzentration HF-COLL-18/514cf über Immuntests gemessen wird.
20. Diagnostikmittel enthaltend das Peptid nach Anspruch 1, Fragmente nach Anspruch 2 oder Antikörper nach Anspruch 8 für Testsysteme zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Substanz.
21. Diagnostikmittel nach Anspruch 20 als Marker für bestimmte Krebserkrankungen sowie für Funktionsstörungen von Blutgefäßen, Knochenmark, Lymphorganen, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von inflammatorischen sowie neoplastischen Prozessen.